

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 20, 1982, pp. 181–183

Direkte Bestimmung von Phenylalanin in Serum mittels Derivativspektrophotometrie

Von K.-H. Kullmann

Lehrstuhl für Allgemeine Chemie und Biochemie der Technischen Universität München, Freising-Weihenstephan

W. Endres

Kinderklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

S. Kirzinger und H.-L. Schmidt

Lehrstuhl für Allgemeine Chemie und Biochemie der Technischen Universität München, Freising-Weihenstephan

(Eingegangen am 15. Juni/4. Dezember 1981)

Zusammenfassung: Es wird ein einfaches und präzises Verfahren zur Bestimmung von Phenylalanin in Serum- oder Plasmaproben mit Hilfe der Derivativspektrophotometrie beschrieben. 100 µl Serum oder Plasma werden nach Entfernung von Protein und Harnsäure direkt auf den Gehalt an Phenylalanin analysiert. Dabei ist die Amplitude zwischen dem Peakminimum bei 254 nm und dem Peakmaximum bei 257 nm des Derivativspektrums (2. Ableitung eines Absorptionsspektrums) einer Probe dem Gehalt an Phenylalanin direkt proportional. Die Präzision beträgt, in Abhängigkeit von der Konzentration an Phenylalanin, 2,1–10,3%, die Wiederfindung liegt zwischen 97,1 und 101,1%. Die Empfindlichkeit beträgt 5 mg/l Serum. Die Methode wurde mit einer säulenchromatographischen Phenylalaninbestimmung verglichen.

Direct determination of phenylalanine in serum by derivative spectrophotometry

Summary: A simple and precise method is described for the determination of phenylalanine in serum or plasma, using derivative spectrophotometry. After the removal of protein and uric acid, 100 µl serum or plasma are analysed directly for phenylalanine. The magnitude of the difference between the peak minimum at 254 nm and the peak maximum at 257 nm of the derivative spectrum (2nd derivative of the absorption spectrum) is directly proportional to the phenylalanine content. The precision was 2.1–10.3%, depending on the concentration of phenylalanine. Recovery was between 97.1 and 101.1%. Sensitivity was 5 mg/l serum. The method was compared with a column chromatographic determination of phenylalanine.

Einführung

Bestimmungen von Phenylalanin im Serum sind zur Diagnose der Phenylketonurie sowie zur Überwachung der Diättherapie notwendig. Die Diagnose (Neugeborenen-Screening) erfordert Serienuntersuchungen mit sehr geringem Probenvolumen. Hierfür hat sich der Bakterienhemmtest nach Guthrie & Susi (1) als geeignet erwiesen. Die Kontrolle der Diättherapie erfordert exaktere Messungen, die vor allem durch die fluorimetrische Bestimmungsmethode nach McCaman & Robins (2) sowie die aufwendigere Ionenaustauscher-Säulenchromatographie (3–5) möglich sind. Die hier vorgeschlagene Methode erfordert ein registrierendes Spektralphotometer mit einem Differenzierzusatz. Sie macht sich die verbesserte spektrale Auflösung von Derivativspektren (graphische Darstellung der Steigung eines Spektrums) zunutze

(Abb. 1). Bei der Differenzierung eines Spektrums können Störungen durch Fremddabsorptionen oder Trübungen eliminiert werden (6, 7). Daher ist eine schnelle und präzise Bestimmung von Phenylalanin in Serum oder Plasma ohne vorherige chromatographische Abtrennung von Phenylalanin und ohne dessen Derivatisierung möglich.

Material und Methoden

Material

Phenylalanin, Natriumborat, Natriumcarbonat und Kreatinin wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, Uricase von der Fa. Boehringer, Mannheim, bezogen. Ultrafiltrationsmembrankegel erhielten wir von der Fa. Amicon GmbH, Witten. Als Photometer verwendeten wir das Zweistrahl-spektralphotometer 555 der Fa. Perkin Elmer, Überlingen, das mit einem serienmäßigen Differenzierzusatz ausgestattet ist.

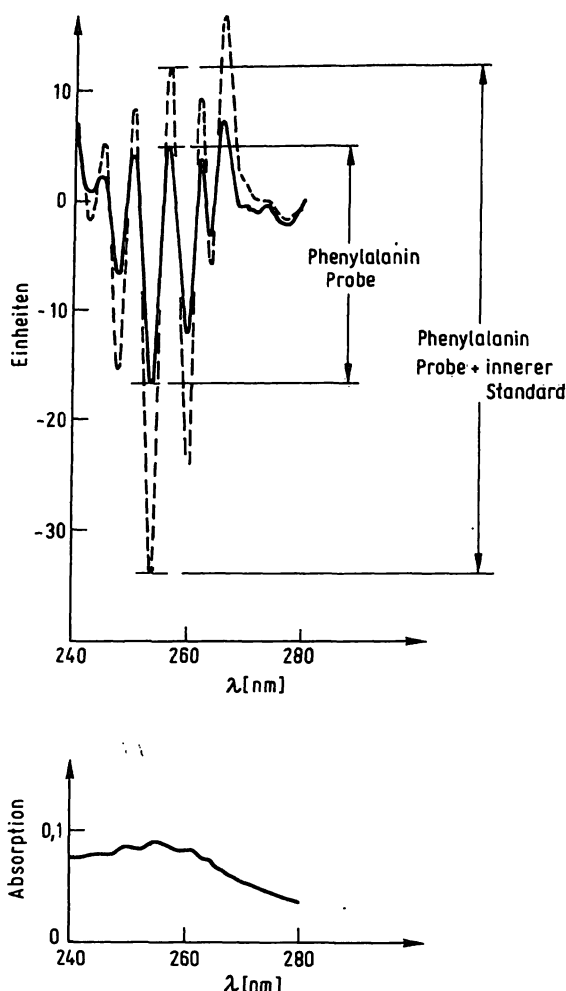


Abb. 1. Absorptionsspektrum (unten) und 2. Ableitung des Absorptionsspektrums (oben) eines Serums mit Phenylalanin. Der Phenylalanin Gehalt der Probe wurde auf den Phenylalanin Gehalt des Inneren Standards (1,2 mmol/l) bezogen.

Methodik

100 µl Serum oder Plasma werden mit 900 µl 5 mmol/l Boratpuffer pH 8,0 und 10 µl Uricase-Lösung (2 g/l) versetzt und 10 min bei 20 °C inkubiert. Die Abtrennung des Proteins erfolgt mit gewässerten (H₂O, 1 h) und vorzentrifugierten (10 min, 900 g) Ultrafiltrationsmembranen (Ausschlußgröße $M_r = 25000$) in 20 min bei 900 g. Von 500 µl des Filtrates wird in einer 1 cm-Halbmikro-Quarzküvette die 2. Ableitung des Absorptionsspektrums zwischen 250 und 280 gegen eine Referenzlösung (5 mmol/l Boratpuffer mit 10 µmol/l Kreatininlösung) registriert (Photometereinstellung: Spaltbreite 1 nm, Schreiberausschlag Abszisse 10 nm/cm, Ordinate 0,02 bis -0,02, Geschwindigkeit 30 nm/min, Zeitkonstante 10 s).

Nach 3maliger Registrierung setzt man der Probe 100 µl Inneren Standard (0,3 mmol/l Phenylalanin bzw. 1,2 mmol/l Phenylalanin) zu und registriert das Spektrum erneut dreimal. Die Abstände zwischen dem Minimum (254 nm) und dem Maximum (257 nm) des Spektrums sind den Phenylalaninkonzentrationen direkt proportional (Abb. 2). Daher erfolgt die Auswertung über eine „Peak zu Peak-Messung“ (Abstandsdifferenz).

Die Konzentrationen in der Serumprobe x (mmol/l) errechnen sich unter Verwendung des Inneren Standards y (mmol/l) und Berücksichtigung der Verdünnungen nach folgender Formel:

$$x = y \cdot \frac{a \cdot f_2 \cdot f_3}{b \cdot f_1 - a} \quad [\text{mmol/l}]$$

- a = registrierter Schreiberausschlag nach Messung der Probe (rel. Einheiten)
- b = registrierter Schreiberausschlag nach Messung der Probe + innerer Standard (rel. Einheiten)
- f_1 = Verdünnungsfaktor für Verdünnung durch Zugabe des inneren Standards
- f_2 = Verdünnungsfaktor für Verdünnung der Serum-Probe
- f_3 = Verdünnungsfaktor für Verdünnung durch Ultrafiltration mit vorgewaschenen Membranen

Für den hier beschriebenen Bestimmungsansatz mit 100 µl Serum oder Plasma ergeben sich folgende Werte:

$$y = 0,06 \text{ bzw. } 0,24 \text{ mmol/l}, \quad f_1 = 1,2, \quad f_2 = 10,1, \quad f_3 = 1,08$$

Die Zeit für 1 Bestimmung beträgt 50 min. Bei gleichzeitiger Bestimmung mehrerer Proben verkürzt sich die Zeit erheblich. Die verwendeten Lösungen sind im Kühlschrank etwa 1 Monat stabil.

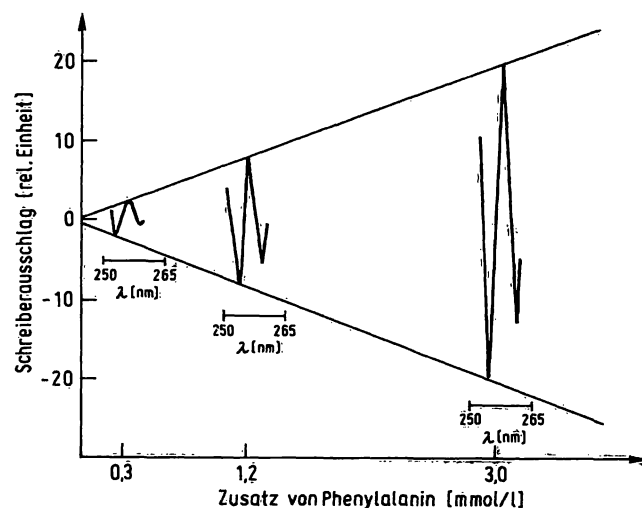


Abb. 2. Schreiberausschlag in Abhängigkeit von der Konzentration an Phenylalanin im Serum (2. Ableitung des Absorptionsspektrums).

Vergleichsmethode

Die säulenchromatographische Bestimmung von Phenylalanin erfolgte mit einem Aminosäuren-Autoanalyzer (LC 2000, Biotronik, München) nach einer weitreichenden Modifikation der von Spackman et al. zur Trennung von Aminosäuren aus physiologischen Flüssigkeiten angegebenen Methode:

Die Trennsäule besteht aus dem Ionenaustauscherharz DC 6A (Durrum) mit den Ausmaßen 0,6 x 20 cm. Die Säulentemperatur steigt zwischen Serin und Asparagin von 36 °C auf 59 °C an. Die verwendeten Lithiumcitratpuffer haben die folgenden Ionenstärken und pH-Werte: Puffer A 0,18 mol/l, pH 2,8, Puffer B 0,23 mol/l, pH 3,1, Puffer C 0,35 mol/l, pH 3,35, Puffer D 0,40 mol/l, pH 4,0, Puffer E 1,65 mol/l, pH 3,3. Die Pufferdurchflußgeschwindigkeit beträgt 31 ml/h.

Ergebnisse

Präzision

Zur Bestimmung der Präzision verwendeten wir ein mit Phenylalanin aufgestocktes Serum. Die Variationskoeffizienten lagen, in Abhängigkeit von der Konzentration an Phenylalanin, zwischen 2,1 und 10,3% (Tab. 1).

Richtigkeit

Auch zur Bestimmung der Wiederfindung wurden mit Phenylalanin aufgestockte Seren verwendet. Die Wiederfindung betrug, in Abhängigkeit von der Konzentration an Phenylalanin, 97,1 bis 101,1% (Tab. 1).

Tab. 1. Wiederfindung und Präzision.

Anzahl der Analysen	Phenylalanin Sollwert ($\mu\text{mol/l}$)	Mittelwert ($\mu\text{mol/l}$)	Wiederfindung (%)	Variationskoeffizient (%)
19	—	91,2	—	10,3
14	391,2	379,8	97,1	4,4
19	1291,2	1272,6	98,6	2,1
18	3091,2	3125,4	101,1	2,6

Spezifität

Dank der hohen spektralen Auflösung eines Derivativspektrums ist die Methode sehr spezifisch. Sie wird durch Tyrosin, Tryptophan, Phenylpyruvat und Phenyl-lactat nicht gestört, da die 2. Ableitung der Spektren dieser Substanzen scharfe und schmale Peaks liefert, die sich mit den zur Auswertung herangezogenen Peaks von Phenylalanin (254–257 nm) nicht überlagern. Hohe Konzentrationen von Harnsäure würden stören, deshalb wurde die im Serum enthaltene Harnsäure vor der Bestimmung mit Uricase abgebaut. Das ebenfalls im Serum enthaltene Kreatinin kann zu einer geringen Störung der Phenylalaninbestimmung führen. Die Referenzküvette enthält deshalb eine annähernd der Konzentration im Serum entsprechende Menge an Kreatinin. Schwankungen des Kreatiningehaltes im Normalbereich wirken sich kaum aus (eine Erhöhung des Kreatiningehaltes um 0,2 mmol/l erniedrigt die gefundenen Phenylalaninkonzentrationen um etwa 1%). Nur bei pathologisch hohen Kreatininkonzentrationen wäre eine Korrektur durch eine entsprechende Erhöhung des Kreatiningehaltes der Referenzküvette erforderlich. Hohe Kreatininkonzentrationen haben im Absorptionsspektrum eine relativ erhöhte Absorption bei 240 nm zur Folge. Für störungsfreie Phenylalaninbestimmungen sollte deshalb die Absorption bei 240 nm kleiner als die bei 260 nm sein. Andernfalls ist eine Korrektur durch entsprechende Erhöhung des Kreatiningehaltes der Referenzküvette angezeigt, wobei eine exakte Kenntnis des Kreatiningehaltes der Probe nicht erforderlich ist.

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze beträgt 3 nmol Phenylalanin (Signal zu Rausch-Verhältnis 3:1). Das sind bei 100 μl Serumprobe 30 $\mu\text{mol/l}$ Phenylalanin.

Literatur

- Guthrie, R. & Susi, A. (1963) *Pediatrics* 32, 338–343.
- McCaman, M. W. & Robins, E. (1962) *J. Lab. Clin. Med.* 59, 885–890.
- Spackman, D. H., Stein, W. H. & Moore, S. (1958) *Anal. Chem.* 30, 1190–1206.
- Schmidt, G. J., Olson, D. C. & Slavin, W. (1979) *J. Chromatogr.* 164, 355–362.
- Tarbit, I. F., Richardson, J. P. & Dale, G. (1980) *J. Chromatogr.* 181, 337–346.

Methodenvergleich

Ein Vergleich der derivativspektrophotometrisch ermittelten Phenylalaninwerte mit den säulenchromatographisch bestimmten Werten ergab eine gute Übereinstimmung ($r = 0,993$) beider Methoden (Abb. 3).

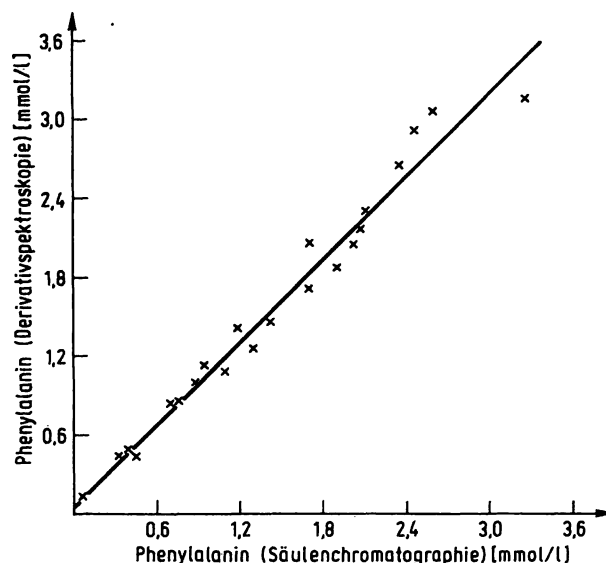


Abb. 3. Vergleich der derivativspektrophotometrischen Phenylalaninbestimmung mit der säulenchromatographischen Methode ($r = 0,993$, $N = 22$, $y = 1,048x + 0,774$).

Diskussion

Das beschriebene Verfahren stellt eine einfache, schnelle und präzise Methode zur Bestimmung von Phenylalanin in Serum oder Plasma dar. Der Vorteil gegenüber gängigen fluorimetrischen und chromatographischen Verfahren liegt bei gleicher Richtigkeit und Präzision im geringen apparativen und zeitlichen Aufwand begründet. Deshalb ist die Methode vor allem zur schnellen Kontrolle der diätetischen Behandlung von Phenylketonurie-Patienten geeignet.

Die Derivativspektrophotometrie wurde bereits mit Erfolg zur Bestimmung von aromatischen Aminosäuren in Bakteriensuspensionen, zellfreien Extrakten und Proteinen eingesetzt (7–9). Auch zur Untersuchung von Humansenen könnte eine gleichzeitige derivativspektrophotometrische Bestimmung von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan von Interesse sein. Zu prüfen wäre auch, inwieweit sich andere Serumkomponenten sowie Komponenten von Speichel und Urin mit Hilfe der Derivativspektrophotometrie erfassen ließen.

Dr. K.-H. Kullmann
Preysingstr. 3
D-8309 Au i. d. Hallertau

I.Q.C.P. Wellcome

Das Immunoassay Qualitätskontrollprogramm
bewertet Ihre Immunoassay-Ergebnisse im
internationalen Vergleich anhand von 16 Parametern
in zwei jährlichen Zyklen

AFP

CEA

HCG

Cortison

Digoxin

Ferritin

Folsäure

Insulin

Östriol

HPL

TSH

T3

T4

T3 Uptake

Vitamin B12

Deutsche Wellcome GmbH

Abteilung Diagnostica

Postfach 109

3006 Burgwedel 1

Telefon (0 51 39) 30 01

Telex 09 22 799 welco d

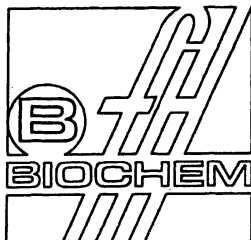


Wellcome
Diagnostica



KARGER '82

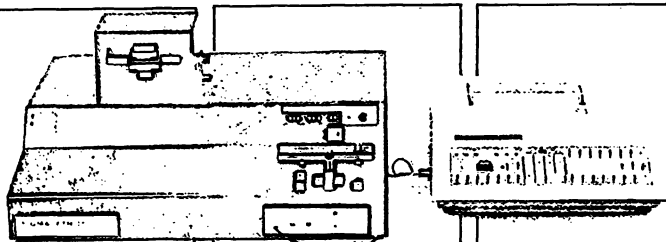
**SIGMA
FTR-20
Scanner**



NEU

Fluoreszenz-
Kinetik
auf
Elektrophorese-
streifen

Analytica
München
27. - 30. April
Halle 7
Stand 7019-7021



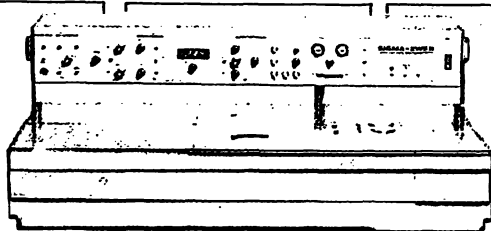
Auswertung von
HPTLC
TLC
Elektrophorese
Gele

Fluoreszenz-
Densitometrie
im
UV-sichtbaren
Bereich

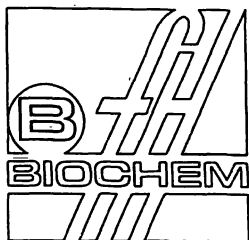
Transmission
Reflexion
Absorption

SIGMA

**ZWS-11
Zweiwellen-
längen
Spektrometer**



Enzymkinetik
Stopped-Flow-
Technik
Organphotometrie
RNS-Schmelz-
kurven



Fluoreszenz
Absorption
Streulicht
Luminiszenz

BIOCHEM
Wissenschaftliche
Geräte GmbH
Benzstraße 28
D-8039 Puchheim
Tel. 089-80 60 81

Survey of Drug Research in Immunological Disease

Vassil St. Georgiev, Rochester, N.Y.

Neu

Vol. 1: **Aliphatic Derivatives**

ca. 600 p., 4 tab., 1982. ca. SFr. 490.- / DM 588.-
ISBN 3-8055-3503-1

Theilheimer's Synthetic Methods of Organic Chemistry

Series Editor: A.F. Finch, Derwent Publications Ltd.,
London

Vol. 36: **Yearbook 1982**

ca. 510 p., 1982. ca. SFr. 498.- / DM 597.-
ISBN 3-8055-3446-9

Neu

Einführung in die praktische Biochemie

für Studierende der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie
und Biologie

3., vollständig neu bearbeitete Auflage
H. Aebi, Bern
ca. 410 S., 1982. ca. SFr./DM 60.-
ISBN 3-8055-3448-5

Neu

Interpretation klinisch-chemischer Laborresultate

2., neu bearbeitete und erweiterte Auflage

Neu

R.D. Eastham, Bristol
übersetzt und bearbeitet von E. Peheim und J.P. Colombo,
Bern
XIV + 262 S., 1981. SFr./DM 29.-
ISBN 3-8055-1879-X

Klinische Chemie

Theorie, Praxis, Interpretation
4., vollständig neu bearbeitete Auflage

Herausgeber: R. Richterich † und J.P. Colombo, Bern
XVI + 620 S., 161 Abb., 137 Tab., 1978
SFr./DM 98.-
ISBN 3-8055-2796-9

Chemie im Laboratorium

Einführung in die allgemeinen theoretischen Grundlagen
mit Einblick in die klinische Chemie und Biochemie
3., erweiterte Auflage

K. Lauber, Liebfeld
VIII + 372 S., 104 Abb., 41 Tab., 1975. SFr./DM 67.-
ISBN 3-8055-2102-2

Bestellungen und
Prospektanfragen richten Sie
bitte an Ihre Buchhandlung
oder an:

S. Karger AG,
Postfach, CH-4009 Basel
S. Karger GmbH,
Postfach 2,
D-8034 Germering/München



KI 82036